

Aus dem Anatomischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Direktoren: Professor Dr. med. M. Watzka, Professor Dr. med. A. Mayet

**ÜBER DEN AUSFALL DER
AgNO₃-ACETON-Ba(OH)₂-METHANOL-REAKTION
AN HISTOLOGISCHEN
SCHILDDRÜSENSCHNITTEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Roland Mayer
aus Heidelberg

Mainz 1973

Aus dem Anatomischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktoren: Professor Dr.med. M.Watzka
Professor Dr.med. A.Mayet

ÜBER DEN AUSFALL DER
 AgNO_3 -ACETON- Ba(OH)_2 -METHANOL-REAKTION
AN HISTOLOGISCHEN SCHILDDRÜSENSCHNITTEN

Inaugural - Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

ROLAND MAYER

aus Heidelberg

MAINZ 1973



Fachbereich 05

Dekan:	Prof. Dr. O. Harth
Referent:	Prof. Dr. G. Müller
Korreferent:	Prof. Dr. M. Watzka

I. Einleitung

Eine färberische Darstellung der parafollikulären Zellen der Schilddrüse ist außerordentlich schwierig (SANDRITTER und KLEIN, 1954; PEARSE, 1966). Kürzlich wurden einige Methoden angegeben, nämlich die Färbung mit Toluidinblau nach Behandlung mit verdünnter HCl (SOLCIA und SAMPIETRO, 1968), die Blei-Haematoxylin Technik (SOLCIA et al., 1969) und die Methode nach GRIMELIUS (1969). Doch auch diese Verfahren konnten nicht vollständig befriedigen und versagten bei einigen Spezies völlig.

In den parafollikulären Zellen wird das von Mac INTYRE 1965 isolierte Hormon Calcitonin gebildet und in deren zahlreichen Granula gespeichert, wie MATSUZAWA und KUROSUMI (1967), YOUNG, CARE und DUNCAN (1968) und ERICSON (1969) zeigen konnten. Eine färberische Darstellung von Thyreocalcitonin im Sinn einer histochemischen Reaktion ist noch nicht beschrieben worden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde an histologischen Schnitten menschlicher und tierischer Schilddrüsen der Reaktionsausfall der von MÜLLER (1964) angegebenen AgNO_3 -Aceton- Ba(OH)_2 -Methanol-Reaktion untersucht. Dabei war besonders darauf zu achten, ob eine spezifische Darstellung der parafollikulären Zellen oder des

in ihnen enthaltenen Calcitonins möglich ist.

II. Vorbemerkung

a) zur AgNO_3 -Aceton- Ba(OH)_2 -Methanol-Reaktion

Die von MÜLLER 1964 entwickelte Reaktion ist eine Abwandlung der Reaktion nach OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA (1953). Beiden Reaktionen liegt die Tatsache zugrunde, daß in alkalischem Milieu Silbernitrat durch reduzierende Substanzen, z.B. durch bestimmte Zucker, zu metallischem Silber reduziert wird.

Läßt man im Reagenzglas eine reduzierende Substanz mit einer alkalischen Silberlösung reagieren, so kann sich das entstandene, zunächst amorphe Silber als sogenannter Silberspiegel an der Glaswand niederschlagen. Nimmt man derartige Versuche mit auf Filterpapier aufgetropften Substanzen vor, so erhält man an den Stellen, wo der reduzierende Stoff aufgetupft worden war, einen braunschwarzen Fleck. Dieser besteht aus feinem Niederschlag von amorphem Silber. Bei Prüfung wasserlöslicher Substanzen auf ihre reduzierenden Eigenschaften muß man zweckmäßigerweise mit möglichst wasserarmen Reagenzlösungen arbeiten, damit keine Dislokationen der an das Filterpapier fixierten Stoffe erfolgen. Bei der Reaktion nach OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA (1953) wird diese

Bedingung, dadurch erfüllt, daß als Lösungsmittel für Silbernitrat Alkohol und für Bariumhydroxid Methanol verwendet wird. MÜLLER (1964) wurde dieser Forderung mehr gerecht, in dem er Silbernitrat in Aceton löste. Methanol verwendete auch er als Lösungsmittel für Bariumhydroxid. Außerdem erübrigte sich durch die Umkehrung der Reihenfolge in der Anwendung dieser Reagenzien eine spezifische Fixierung. Mit diesen beiden Reaktionen wurden dann Versuche von MÜLLER (1962 und 1964), PUSCH (1964) und STILLER (1965) mit reduzierenden Substanzen, vor allem mit Zuckern, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle I aufgeführt. Dabei wurden die Teststreifen mit der aufgetropften Substanz zuerst in die Silbernitrat-Aceton- und dann in die Ba(OH)_2 -Methanol-Lösung gegeben bzw. zuerst mit Ba(OH)_2 -Methanol und dann mit AgNO_3 -Alkohol behandelt. Es zeigte sich, daß bei der Verwendung wasserarmer Lösungsmittel keine sichtbare Dislokation der aufgetropften Kohlenhydrate erfolgte. Damit erschienen die Reaktionen geeignet, auch am histologischen Schnittpräparat wasserlösliche reduzierende Substanzen im Sinne einer histotopochemischen Reaktion zu erfassen. Derartige Versuche wurden dann auch von MÜLLER (1955) an Leber, Niere und am Darm (1957), von GEYER (1960) an der Niere, von EHRENBRAND (1961) an der Milchdrüse und von LANGE (1967) und (1968) am Kleinhirn, der Niere und

am gesamten ZNS durchgeführt. Die Ergebnisse waren durchwegs positiv.

GERBER (1967) untersuchte dann, ob die Silbernitrat-Aceton-Bariumhydroxid-Methanol-Reaktion nicht durch andere, ebenfalls reduzierend wirkende und in den Zellen anwesende Substanzen, vor allem Aminosäuren, gestört oder überlagert werden kann. Er testete daraufhin 20 auf Teststreifen aufgetropfte Aminosäuren, die in Tabelle II zusammengestellt sind. Von ihnen reagierten konstant nur Cystein und Cystin. Da GERBER mit molaren Lösungen arbeitete, konnte er zeigen, daß die positiven Cystinflecke eine etwa doppelt so hohe Farbintensität wie die Cysteinflecke hatten. Das deutet darauf hin, daß während der Reaktion die S-S-Brücke des Cystins aufgebrochen wird und so letztlich aus einem Mol Cystin zwei Mol Cystein entstehen, welche dann die eigentliche Reaktion ergeben. Die Farbe dieser Cysteinflecke schwankte in Abhängigkeit von der Reaktionszeit zwischen hellbraun bei kurzen und braunschwarz bei langen Einwirkungszeiten. Ferner konnte er zeigen, daß die Reaktion von reduzierenden Zuckern nur durch sehr hohe Konzentrationen von Cystin oder Cystein beeinflußt werden, wie sie nur in ganz wenigen Geweben physiologischerweise vorkommen. GERBER untersuchte auch Gewebe, die eine sehr hohe Konzentration

an Cystein und Cystin enthalten. An Kryostatschnitten der menschlichen Kopfhaut, die ja reich an diesen beiden Aminosäuren ist, die beim Haarwachstum in der Wurzelscheide in das Haar eingebaut werden, zeigte sich, daß neben den Wurzelscheiden der Haare und den Talgdrüsen auch das verhornte Plattenepithel deutlich positiv reagiert. GERBER folgerte daraus Cystein nachgewiesen zu haben.

Da in einem Molekül Calcitonin 1 Molekül Cystin enthalten ist, das durch die Reaktionseinwirkung in zwei Moleküle Cystein gespalten wird, und durch die Anreicherung des Hormons in den hellen Bläschen der parafollikulären Zellen (MATSUZAWA et al. lit.c.) eine hohe Cysteinkonzentration erreicht werden müßte, könnte man auch dort mit einem positiven Reaktionsausfall rechnen.

b) zum mikroskopischen Aufbau der zu untersuchenden Schilddrüsenbestandteile

Da bei der nachfolgenden Untersuchung sowohl auf die Follikelzellen als auch auf die parafollikulären Zellen und das Kolloid geachtet werden soll, möchte ich, um den Reaktionsausfall besser deuten zu können, eine kurze Charakterisierung dieser drei typischen Schilddrüsenbestandteile voranstellen. Dabei möchte ich mich

besonders auf Untersuchungen von LEPLOND und YOUNG (1963), NUNEZ, GOULD, HAMILTON, HAYWARD und HOLT (1967) und LEPLOND, WHUR und HERSCOVICS (1969) stützen.

1. Die Follikelzellen

Die Follikelzellen sind meist pyramidenförmige Zellen, die um das Kolloid angeordnet sind. Die Zellbasen sitzen einer Basalmembran auf, und die Zellspitzen haben unregelmäßig angeordnete Mikrovilli, welche in das Kolloid des Follikellumens hineinragen. Das Ergastoplasma mit seinen charakteristisch weit geöffneten Cysternen ist über das ganze Cytoplasma der Zelle verteilt. Ribosomen bedecken die Oberfläche der Cysternenmembranen und sind zumeist in Doppelketten angeordnet. Der auffallende Golgiapparat enthält Gruppen von abgeflachten Blasen, die Golgisäcke, welche unregelmäßig erweitert sind. Daneben sind noch kugelige Bläschen von ungefähr $0,15 \mu$ Durchmesser vorhanden. Identische Bläschen sind in der Spitzenzone als sogenannte Apex vesiculis und anschließend im Kolloid zu sehen.

Außerdem kommen im Cytoplasma der Follikelzellen noch zwei besondere Strukturen vor. Die ersten sind große, hell gefärbte, glatt begrenzte Kugeln von meist $1,5 \mu$ oder größer im Durchmesser. Sie werden als Kolloidtröpfchen bezeichnet. Der zweite Typ der

Strukturen ist kleiner, dicht gefärbt und in eine glatte Membran eingeschlossen. Wegen ihrer Ähnlichkeit mit den Zymogengranula werden sie als zymogen-ähnliche Granula bezeichnet.

In den Follikelzellen erfolgt die Synthese des Thyreoglobulins. Dieses ist ein Glykoproteid mit einem Molekulargewicht von 660 000 und einer Sedimentationskonstanten von S 19. Es besteht nach MEANS, de GROOT und STANBURY (1963) aus 18 verschiedenen Aminosäuren, die 71,2 % des Moleküls ausmachen. Der prozentuale Anteil von Cystein beträgt 3,6 %. Die 4,3 % Hexosen, vor allem Galaktose, Mannose und ein geringer Betrag an Fruktose, sind wie die 4 % Glucosamine in kovalenter Bindung an die Polypeptidketten angefügt (ROBBINS und RALL, 1960). An den zahlreichen Tyrosinresten des Thyreoglobulins erfolgt durch Jodierung dieser Radikale die Thyroxinsynthese. Dieser Vorgang soll allerdings erst im Kolloid stattfinden (WOLLMANN und WODINSKI, 1965; NADLER, 1965 und GROSS et al., 1965).

Das Thyreoglobulin verschiedener Spezies hat zwar das gleiche Molekulargewicht, unterscheidet sich jedoch durch Unterschiede in der prozentualen Verteilung der einzelnen Komponenten (MORAIS und GOLDBERG, 1967).

Der Syntheseweg des Thyreoglobulins führt vom Ergastoplasma über den Golgiapparat in die Spitzenbläschen

und von dort ins Kolloid. Dabei konnte man autoradiologisch zeigen, daß die Mannose-Inkorporation schon im endoplasmatischen Retikulum und der Galaktoseeinbau erst im Golgiapparat erfolgt (LEPLOND 1969). Vom Golgiapparat migrieren dann die Thyreoglobulinbruchstücke mit der Sedimentationskonstanten von S 12 über die Spitzenbläschen ins Kolloid, wo dann in einem relativ langsamen Prozeß die Umwandlung in die fertigen S 19 Moleküle stattfindet.

2. Die parafollikulären Zellen

Die parafollikulären Zellen wurden schon 1876 von BABER beschrieben. Sie sollen von den ultimobranchialen Regionen der embryonalen Schlundtaschen abstammen (CARVALHEIRA und PEARSE, 1967), haben eine typische Ultrastruktur und unterscheiden sich lichtmikroskopisch von den Follikelzellen durch ihr heller gefärbtes Cytoplasma, weswegen sie auch von vielen Autoren als "light cells" oder helle Zellen bezeichnet werden. Sie liegen einzeln, zu zweit oder dritt innerhalb der Basalmembran eines Follikels, treten aber niemals mit dem Kolloid des Follikellumens in Kontakt und machen 1 % bis 5 % der Epithelzellen der Schilddrüse aus. FOSTER, Mac INTYRE und PEARSE (1964) konnten beweisen, daß in ihnen die Produktion von Thyreocalcitonin stattfindet.

Elektronenmikroskopisch fällt auf (LEPLOND 1963), daß das Ergastoplasma der parafollikulären Zellen, oder C-Zellen, wie sie bisweilen auch genannt werden, gewöhnlich in einer Zellecke lokalisiert ist und aus engen Cysternen mit relativ wenigen Ribosomen besteht, im Gegensatz zu den Follikelzellen, wo das Ergastoplasma über die ganze Zelle zerstreut ist, aus weiten Cysternen besteht und die Ribosomen in Doppelketten um die Cysternen angeordnet sind. Die Golgizone ist in den parafollikulären Zellen klar ersichtlich. Sie hat oft Hufeisengestalt und besteht gewöhnlich aus dichtgepackten, abgeflachten Säcken und Tuben mit einem gleichweiten Lumen. In der Golgizone sind zahlreiche runde Gebilde mit gleichem Durchmesser wie die Golgitubuli von $0,05 \mu$ wie auch größere von $0,15$ bis $0,25 \mu$ zu sehen, die gewöhnlich hell und mehr oder weniger leer erscheinen. Diese Gebilde sind die hellen Bläschen. Helle Bläschen werden auch im ganzen Cytoplasma gefunden. Sie können eine unregelmäßige und sogar aufgebrochene Membran haben und gelegentlich scheinen sie sich aufzulösen. MATSUZAWA und KUROSUMI (1967), YOUNG, CARE, DUNCAN (1968) und ERICSON (1968) konnten, wie schon erwähnt, zeigen, daß diese Bläschen Speicherorganellen für Calcitonin sind.

3. Das Kolloid

Das Kolloid ist eine visköse Flüssigkeit, in der sich 90 % bis 95 % des gesamten Thyreoglobulins befinden. Es ist der Platz der Jodierung des Thyreoglobulins (WOLLMANN und WODINSKI 1965, NADLER 1965, GROSS et al. 1965), während die Vorstufen im Cytoplasma der Follikelzellen entstehen. Da die Kohlenhydrate des Thyreoglobulins, wie schon beschrieben, bereits in den Follikelzellen in das Molekül eingebaut werden, also im Kolloid schon in gebundener Form vorliegen, und Jod, wie MÜLLER in einem Versuch gezeigt hat, nicht mit der AgNO_3 -Aceton- Ba(OH)_2 -Methanol-Reaktion zu erfassen ist, könnte ein positiver Befund in diesem Schilddrüsenbestandteil von den 3,6 % Cysteinanteil des Thyreoglobulins herrühren.

c) zu molekularem Aufbau und Wirkung von Thyreocalcitonin (TCT)

Von der Existenz eines den Serumcalciumspiegel erniedrigenden Hormons wurde bereits 1962 von COPP et al. berichtet. 1964 konnten FOSTER, Mac INTYRE und PEARSE die thyroidalen C-Zellen als Entstehungsort angeben, und 1965 gelang Mac INTYRE die Isolierung dieses Hormons aus Schweineschilddrüsen. Später wurde dann auch Calcitonin aus Schilddrüsen anderer Spezies isoliert. So von NEHER et al. (1968) aus Menschen- und von BREWER

(1969) aus Rinderschilddrüsen. Dabei konnte übereinstimmend festgestellt werden, daß es sich um ein Polypeptid aus 32 Aminosäuren handelt, darunter zwei Cysteinmoleküle in 1 - 7 Stellung, die eine Disulfidbrücke bilden. Auch trat regelmäßig in Stellung 32 Prolin mit endständiger NH_2 -Gruppe auf. Allerdings unterscheiden sich die Calcitoninmoleküle verschiedener Spezies durch ihre Aminosäuresequenz. Da in der vorliegenden Arbeit Schilddrüsenschnitte vom Schwein, Rind und vom Menschen untersucht wurden, möchte ich durch Tabelle III die Unterschiede in der Aminosäuresequenz aufzeigen.

Calcitonin kann als Parathormonantagonist angesehen werden, mit direkter Wirkung auf die Nierentubuli und die Knochenzellen. Bei letzteren verhindert es die Calciummobilisation, indem es die Phosphodiesterase stimulieren soll, dadurch einen schnelleren Abbau des cyclischen AMPs bewirkt und so die Wirkung des Parathormons verkürzt. Der hypothetische Wirkungsmechanismus nach WELLS und LLOYD (1969) ist in Tafel 1 dargestellt. Was die Wirkung auf die Niere betrifft, so haben PAK, RUSKIN und CASPER (1969) eine direkte Erhöhung der Calciumclearance bewiesen und MILHAUD, MOUKHTAR, PERAULT-STAUD und COUTRIS (1969) bestätigten dies und zeigten, daß außerdem auch die Phosphat- und Natrium-

ausscheidung durch direkten Angriff des Thyreocalcitonins am Tubulusepithel erhöht wird.

TCT wird, wie schon erwähnt, im Ergastoplasma und im Golgiapparat der C-Zellen synthetisiert und gelangt von dort, vor der Abgabe in die Blutbahn, in die hellen Bläschen. In diesen Zellorganellen müßte also mit einer Anreicherung des Hormons oder von Hormonvorstufen zu rechnen sein. Dies würde aber auch eine erhöhte Cysteinkonzentration in diesen Strukturen bedeuten, die mit der AgNO_3 -Aceton- $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Methanol-Reaktion vielleicht erfaßt werden könnte.

Tabelle I

Aufstellung der Versuchsergebnisse von MÜLLER (1964) und PUSCH (1964) mit der Silbernitrat-Aceton-Bariumhydroxid-Methanol-Reaktion und der Ergebnisse von MÜLLER (1962) und STILLER (1965) mit der Reaktion nach OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA

Substanz	MÜLLER	STILLER	MÜLLER	PUSCH
Formol	(+)	Ø	++	++
Aethylenglykol	-	Ø	-	-
Glycerin	-	Ø	+	+
Arabinose	++	++	++	++
Xylose	++	++	++	++
Xylit	++	Ø	+	+
Glukose	++	++	++	++
3-O-Methylglukose	(+)	Ø	+	+
3-O-Aethylglukose	(+)	Ø	+	+
Fructose	++	++	+	++
Galaktose	++	++	++	++
Mannose	++	++	+	+
Mannit	++	Ø	+	+
Sorbose	++	Ø	++	+
Sorbit	++	Ø	+	+
Saccharose	-	-	-	-
Lactose	+	Ø	(+)	(+)
3-Phosphoglycerinsäure	Ø	-	Ø	Ø
Glukose-1-phosphat	(+)	(+)	-	-
Glukose-6-phosphat	Ø	(+)	-	-
Fructose-1-phosphat	(+)	-	Ø	-
Fructose-6-phosphat	Ø	(+)	Ø	Ø
Fructose-1,6-phosphat	Ø	(+)	-	Ø

Ø = nicht getestet; - = negativer Reaktionsausfall; (+) = schwache Reaktion; + = mittelstarke Reaktion; ++ = starke Reaktion

Tabelle II

Zusammenstellung der von GERBER (1967) getesteten Aminosäuren. Angaben wie Molekulargewicht, chemische Bezeichnung und Löslichkeit aus "Index Merck", Darmstadt (1961)

Name	Abkürzung	MG	Laq (25°)
Glykokoll	Gly	75,05	1+4
Alanin	Ala	89,10	1+6
Valin	Val	117,15	1+11
Leucin	Leu	131,17	1+106 (15°)
Phenylalanin	Phe	165,20	1 + 34
Prolin	Pro	115,13	1+0,62
Serin	Ser	105,09	1+4
Threonin	Thre	119,12	---
Hippursäure	Hip	179,17	1+65 (18°)
Sarkosin	Sar	89,09	1+1,4 (20°)
Cystein	Cys-SH	121,16	sehr leicht löslich
Cystin	Cys-S	240,30	unlöslich
Methionin	Meth	149,21	1+30
Tryptophan	Try	204,23	1+87
Tyrosin	Tyr	181,19	1+2200
Asparaginsäure	Asp	133,11	1+200
Glutaminsäure	Glu	147,13	1+150 (21°)
Lysin	Lys	146,19	sehr leicht
Arginin	Arg	174,21	1+7
Histidin	His	155,16	1+25

Von diesen Aminosäuren reagierten mit der Silbernitrat-Aceton-Bariumhydroxid-Methanol-Reaktion konstant nur Cystin und Cystein.

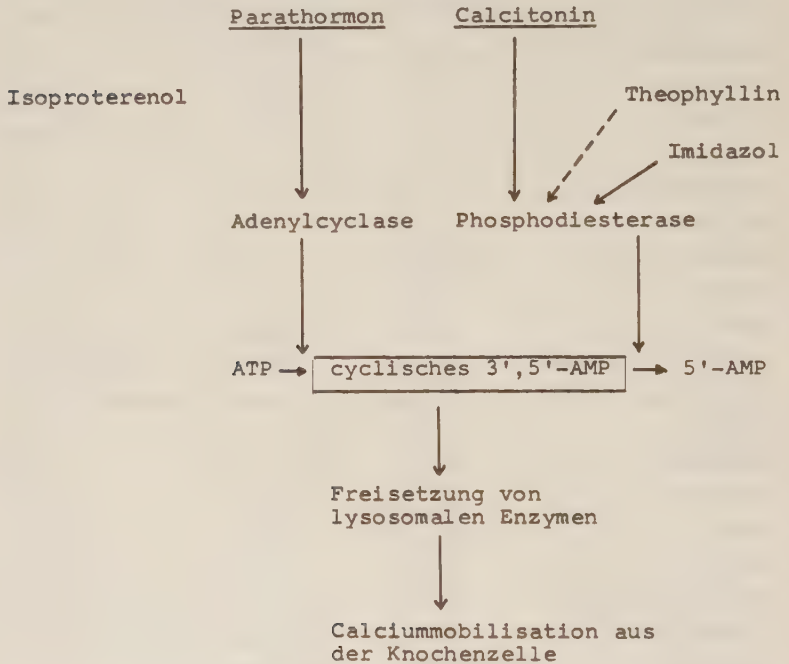
Tabelle III

Zusammenstellung der Aminosäuren des Thyreocalcitonins
von Schwein, Rind und Mensch (BREWER, jr., 1969)

Aminosäure	Schwein	Rind	Mensch
Asparaginsäure	0	1	1
Asparagin	4	3	2
Threonin	2	2	5
Serin	4	4	1
Glutaminsäure	1	1	0
Glutamin	0	0	2
Prolin	2	2	2
Glykokoll	3	3	4
Alanin	1	1	2
Cystein	2	2	2
Valin	1	1	1
Methionin	1	1	1
Isoleucin	0	0	1
Leucin	3	3	2
Tyrosin	1	2	1
Phenylalanin	3	2	3
Tryptophan	1	1	0
Lysin	0	1	1
Histidin	1	1	1
Arginin	2	1	0

Tafel I

Schema über den Wirkungsmechanismus von Calcitonin auf die Knochenzelle nach WELLS und LLOYD (1969)



ausgezogene Pfeile bedeuten fördernde Wirkung
gestrichelte Pfeile bedeuten hemmende Wirkung

Experimenteller Teil

III. Material und Methodik

Reaktionslösungen:

Bei der Durchführung der Versuche wurden die Reaktionslösungen frisch hergestellt.

Die Silbernitrat-Aceton-Lösung dadurch, daß 2 g AgNO_3 in 100 ml Aceton gelöst wurden. Zur Herstellung der Bariumhydroxid-Methanol-Lösung wurden 5 g Ba(OH)_2 in 100 ml Methanol gegeben. Beide Ansätze wurden 10 Minuten geschüttelt, dann filtriert und das klare Filtrat für die Reaktion verwendet.

Schilddrüsenschnitte:

Die Untersuchungen wurden an jeweils drei Menschen-, drei Schweine- und drei Rinderschilddrüsen verschiedenen Alters und Geschlechts durchgeführt. Dabei handelte es sich im einzelnen bei den Menschenschilddrüsen um Schilddrüsenproben einer 37 Jahre alten Frau, die an einem Narkosezwischenfall gestorben ist, eines 61-jährigen Mannes, der einem Herzinfarkt erlag und einer 71-jährigen Frau, deren Todesursache eine Apoplexia cerebri war. Die Schweineschilddrüsen stammten von weiblichen Tieren (6 und 18 Monate alt) und einem 6 Monate alten Eber. Bei den Rinderschilddrüsen wurde wiederum die gleiche Geschlechtsverteilung gewählt. Hier waren die weiblichen

Tiere 4 und 8 Jahre, das männliche Tier 18 Monate alt. Das Untersuchungsmaterial wurde zunächst im Kryostaten eingefroren und anschließend in 10 μ dicke Schnitte zerlegt. Von jeder Probe wurden 18 Schnitte angefertigt, die in vier Versuchsreihen weiterbehandelt wurden.

Versuchsreihen:

Es wurden 4 Versuchsreihen mit jeweils 4 Präparaten durchgeführt.

1. Versuchsreihe: Die Schnitte wurden bei Zimmertemperatur und im Dunkeln eine Stunde in die AgNO_3 -Aceton-Lösung gegeben, dann ein Präparat für 10, eines für 20, eines für 30 und eines für 60 Minuten in die Ba(OH)_2 -Methanol-Lösung gebracht. Danach ließ man alle Präparate zur Fixierung 2 Minuten mit 5%iger Natriumthiosulfatlösung reagieren. Das nun folgende Wässern unter schwach fließendem Leitungswasser, die Haematoxylin-Eosin Gegenfärbung und das anschließende Eindecken wurden wieder bei Tageslicht vorgenommen.

2. Versuchsreihe: Es wurde wie bei der ersten Versuchsreihe vorgegangen, nur wurde hier auf eine Gegenfärbung mit Haematoxylin-Eosin verzichtet.

3. Versuchsreihe: Diese Präparate wurden zuerst für eine halbe Stunde bei Tageslicht in 70%igen Alkohol gegeben, in destilliertem Wasser eine halbe Stunde lang gewässert und dann, wie oben beschrieben, weiterbehandelt.

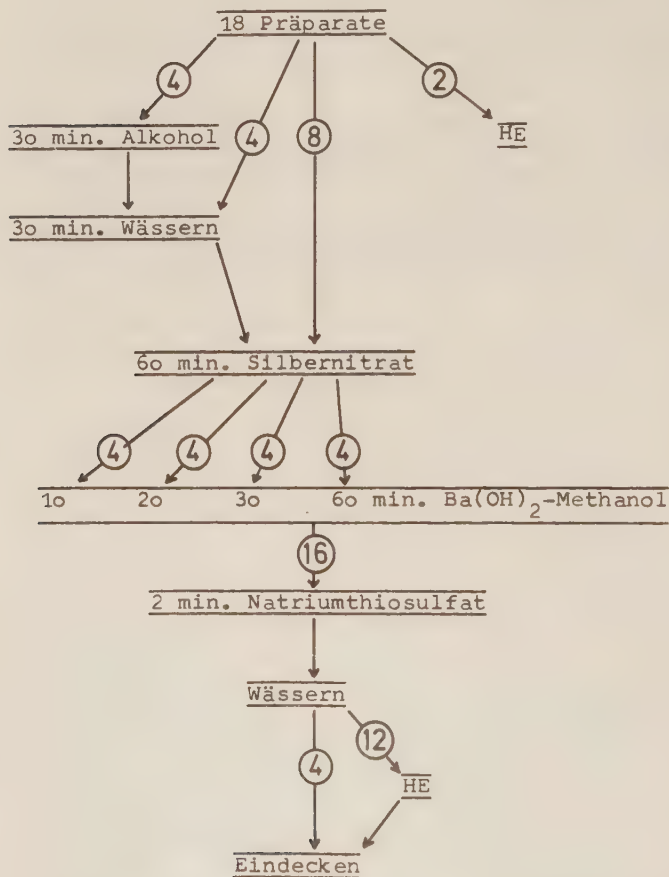
4. Versuchsreihe: Hier wurden die Präparate vor der angegebenen Reaktionsfolge eine halbe Stunde in destilliertem Wasser gewässert.

Außerdem wurden von jeder zu untersuchenden Probe zwei Schnitte nur mit HE gefärbt.

Eine schematische Übersicht über die Reihenfolge und Einwirkungsdauer der einzelnen Reagenzien dieser Versuchsreihen ist in Tafel 2 dargestellt.

Tafel 2

Schema über die Behandlung der 18 Schilddrüsenschnitte,
die von jedem Objekt angefertigt wurden



Die eingekreisten Angaben bedeuten Anzahl der Präparate

IV. Befunde

A) Schweineschilddrüsen

Es wurden zwei weibliche und ein männliches Tier untersucht. Die Präparate zeigten starke Reaktion. Die einzelnen Schilddrüsenbestandteile boten im einzelnen folgendes Bild.

Die Follikelzellen

Generell kann man zwischen einem diffusen Braun und schwarzen Granula unterscheiden. Durch ersteres werden die Follikelzellen vom basalen bis zum apikalen Ende gleichmäßig braun gefärbt. Unter den einzelnen Zellen kann man jedoch geringe Intensitätsunterschiede der Braunfärbung feststellen. Die schwarzen Granula haben unterschiedliche Größe, sind in den basalen Zellregionen relativ spärlich, nehmen zur Zellspitze hin kontinuierlich an Anzahl zu und schließen sich dann zu einem breiten apikalen Saum zusammen, der nur ganz selten unterbrochen wirkt.

Die parafollikulären Zellen sind bei den Schweineschilddrüsen deutlich als helle Inseln zu erkennen, da sie von dem diffusen Braun, das die Follikelzellen anfärbt, fast gänzlich ausgespart werden. Sie liegen fast immer einzeln (nur ganz selten zu zweit), berühren das Follikellumen nie und haben einen runden bis ovalen Kern in Zellmitte.

Außerdem zeigen sie eine deutliche schwarze Granulierung, die im Gegensatz zu den Follikelzellen gleichmäßig über das ganze Cytoplasma verteilt ist. Diese Granula, die fast alle gleich groß sind, liegen weniger dicht als die Granula der Follikelzellen in deren basalen Bezirken.

Das Kolloid zeigt keinerlei Reaktionseinwirkung. Außer in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Follikelzellen sind einige schwarze Granula festzustellen. Sie liegen fein verteilt in einer schmalen Zone, die sich dem apikalen Saum der Follikelzellen auflegt. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Spitzenbläschen, die von den Follikelzellen ins Kolloid migrieren und sich dort auflösen.

B) Menschliche Schilddrüsen

Wie erwähnt wurden die Schilddrüsen zweier Frauen und eines Mannes untersucht. Bezüglich des Reaktionsausfalles ähneln die Präparate sehr denjenigen der Schweineschilddrüsen. Im einzelnen ist zu den beiden Zelltypen und zum Kolloid folgendes zu sagen:

Follikelzellen

Sie werden wie die Follikelzellen der Schweineschilddrüsen fast gänzlich von einem diffusen hellen Braun, im Bild Graubraun, ausgefüllt. Allerdings sind hier im Gegensatz zum Schwein die Zellen nicht gleichmäßig mit diesem

Braun überzogen, sondern es lassen sich ganz deutlich Zentren mit intensiver Braunfärbung und Zentren, die nur wenig von der Reaktion erfaßt wurden und nur ein zartes Graubraun aufweisen, unterscheiden. Auch weisen die Zellen unter sich relativ große Unterschiede in der Farbtintensität auf. Die schwarzen Granula, wie sie beim Schwein beschrieben werden, sind in den basalen und zentralen Zellabschnitten der menschlichen Follikelzellen nur vereinzelt zu finden, treten aber in den apikalen Zellregionen wieder gehäuft auf und schließen auch hier fast überall zu einem einheitlichen apikalen Saum zusammen, der das Follikellumen in wechselnder Dicke wie ein Ring umgibt.

Parafollikuläre Zellen

Auch sie lassen in bezug auf die AgNO_3 -Aceton- Ba(OH)_2 -Methanol-Reaktion sehr viel Ähnlichkeit mit den parafollikulären Zellen der Schweineschilddrüsen erkennen. Wie bei diesen werden auch beim Menschen die C-Zellen von dem alle Follikelzellen ausfüllenden diffusen Braun ausgespart und zeigen ein über die ganze Zelle verteiltes ganz schwaches Grau. Schwarze Granula sind auch hier zu finden, scheinen jedoch im Vergleich zum Schwein in der Anzahl vermindert, dafür aber fast doppelt so groß zu sein. Die C-Zellen sind beim Menschen schwerer zu erkennen als beim Schwein und scheinen auch in einem geringeren Prozentsatz vorzukommen.

Kolloid

Es verhält sich ganz wie das Kolloid der Schweine-
schilddrüsen. Außer in einer schmalen Randzone, wo
sich zahlreiche hellbraune Granula aus dem apikalen
Saum der Follikelzellen herauszulösen scheinen, ent-
hält das Kolloid auch hier nirgends Stellen, die von
der Reaktion erfaßt werden.

C) Rinderschilddrüsen

Die Schnitte aller drei untersuchten Tiere zeigen ein
sehr buntes Bild und unterscheiden sich stark von den
Präparaten der Schweine- und Menschenschilddrüsen.

Zellen

Man muß hier zwischen vier verschiedenen Farbtönen unter-
scheiden, nämlich einem hellen und einem dunklen Braun,
einem Graubraun und einem hellgrauen Farbton. Es ist
sehr schwer, diese verschiedenen Farben Zellgruppen
oder gar Zellorganellen zuzuteilen. Allgemein kann man
sagen, daß das Graubraun vorherrscht und die Mehrzahl
der Follikelzellen ausfüllt. Das helle Braun tritt rela-
tiv selten auf und ist dann auf kleine Stellen begrenzt.
Vielleicht handelt es sich dabei um die parafollikulären
Zellen. Die dunkelbraunen Granula haben Zellkerngröße
und sind nur in manchen Zellen zu finden. Der auch hier
vorhandene apikale Saum ist hellgrau und ist von dem
Graubraun der Zellen deutlich abzugrenzen.

Kolloid

Zum großen Unterschied zu den anderen Spezies zeigt hier auch das Kolloid Reaktionseinwirkung. Und zwar wird es ganz gleichmäßig, ohne irgendwelche Intensitätsunterschiede, rötlich braun gefärbt. Sonst verhält sich das Kolloid auch hier wie bei den anderen Präparaten. Am Rand sind noch einige Granula zu erkennen, die immer kleiner werden, weniger scharf begrenzt erscheinen und sich dann schließlich auflösen.

D) Über den Ausfall der Kontrollreaktionen

Es wurden zwei verschiedene Kontrollreaktionen durchgeführt. Die eine Versuchsreihe wurde, wie das Schema, Tafel 2, zeigt, bevor die Behandlung mit der AgNO_3 -Aceton- Ba(OH)_2 -Methanol-Reaktion begonnen wurde, eine halbe Stunde in destilliertes Wasser gegeben. Die andere Reihe wurde zuerst 30 Minuten mit 70%igem Alkohol behandelt und dann ebenfalls in destilliertem Wasser für eine halbe Stunde gewässert, bevor sie nach bereits beschriebener Methode weiterbehandelt wurde. Beide Kontrollreaktionen lassen bei den Menschen-, Schweine- und Rinderschilddrüsen keine Unterschiede erkennen und können deswegen zusammen abgehandelt werden.

Die mit destilliertem Wasser vorbehandelten Präparate

Die nur mit destilliertem Wasser vorbehandelten Schnitte

lassen keine spezifische Reaktion mehr erkennen. Das diffuse Braun, das alle Follikelzellen ausfüllte und auch in den parafollikulären Zellen als schwache bräunliche Tönung zu erkennen war, ist völlig verschwunden, und die schwarzen Granula verklumpen zusammen mit anderen Zellstrukturen unter Bildung von dichten Netzen. Sie scheinen losgelöst und als dichte Flocken über dem Präparat zu schwimmen. Oft sind solche weggeschwemmte Fragmente auch im Innern des Follikellumens anzutreffen. Es ist also durch das Wässern offensichtlich zu einem Herauslösen der Braunfärbung und zu einer Dislokation der Granula gekommen. Diese Tatsache trifft bei den Schweineschilddrüsen sowohl für die Follikelzellen als auch für die parafollikulären Zellen zu.

Die mit Alkohol vorbehandelten Präparate:

Diejenigen Kontrollpräparate, die vor dem Wässern noch eine halbe Stunde in 70%igen Alkohol gegeben wurden, unterscheiden sich dagegen kaum von den nur mit der AgNO_3 -Aceton- Ba(OH)_2 -Methanol-Reaktion behandelten Präparaten. Sie zeigen die gleiche Verteilung der Granula und die gleichen Braunintensitäten wie die Hauptversuchsreihen. Man kann annehmen, daß die reagierenden Substanzen durch die Alkoholeinwirkung fixiert oder agglutiniert wurden und dies auch nicht mehr durch die anschließende Wassereinwirkung rückgängig gemacht werden konnte.

Auch kann man folgern, daß der Alkohol die reaktiven Gruppen nicht verändert hat, da die dann folgende AgNO_3 -Aceton- Ba(OH)_2 -Methanol-Reaktion die gleichen Ergebnisse liefert, wie sie die Präparate, die nur mit Silbernitrat-Aceton und Bariumhydroxid-Methanol behandelt wurden, zeigen. Allerdings sind die C-Zellen hier nicht mehr mit Sicherheit zu unterscheiden.

E) Geschlechts- und Altersunterschiede

Das Untersuchungsmaterial wurde so gewählt, daß sowohl bei den tierischen als auch menschlichen Schilddrüsen Proben von beiden Geschlechtern und von verschiedenen Altersstufen verwendet wurden. Bei der Auswertung der Präparate mußte dann auch darauf geachtet werden, ob der Ausfall der Reaktion vielleicht auch von Faktoren mitbeeinflusst wird, die Alters- oder Geschlechtsunterschieden zuzuschreiben sind. Es wurden jedoch weder beim Menschen noch beim Schwein oder Rind in bezug auf den Reaktionsausfall Unterschiede zwischen den Geschlechtern und den verschiedenen Altersstufen festgestellt.

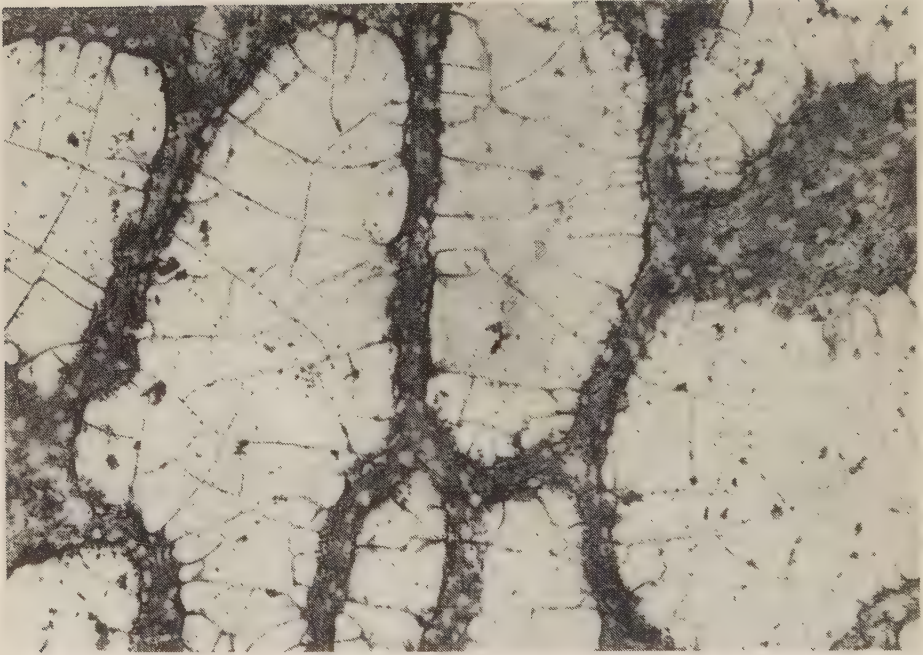


Abbildung 1

Schweineschilddrüse. Reaktion nach MÜLLER:
Silbernitrat-Aceton(2,0/100,0)-Bariumhydroxid-
Methanol(5,0/100,0)
30 Minuten, Zimmertemperatur. Vergrößerung: 32 x

Man sieht das diffuse Grau (im Präparat braun),
das alle Follikelzellen ausfüllt und die schwarzen
Granula, die zu einem apikalen Saum zusammenschließen.
Die parafollikulären Zellen mit ihrer feineren Granu-
lierung sind deutlich als helle Aussparungen zu er-
kennen. Die Kolloidsprünge und die Flocken über dem
Kolloid sind Artefakte.

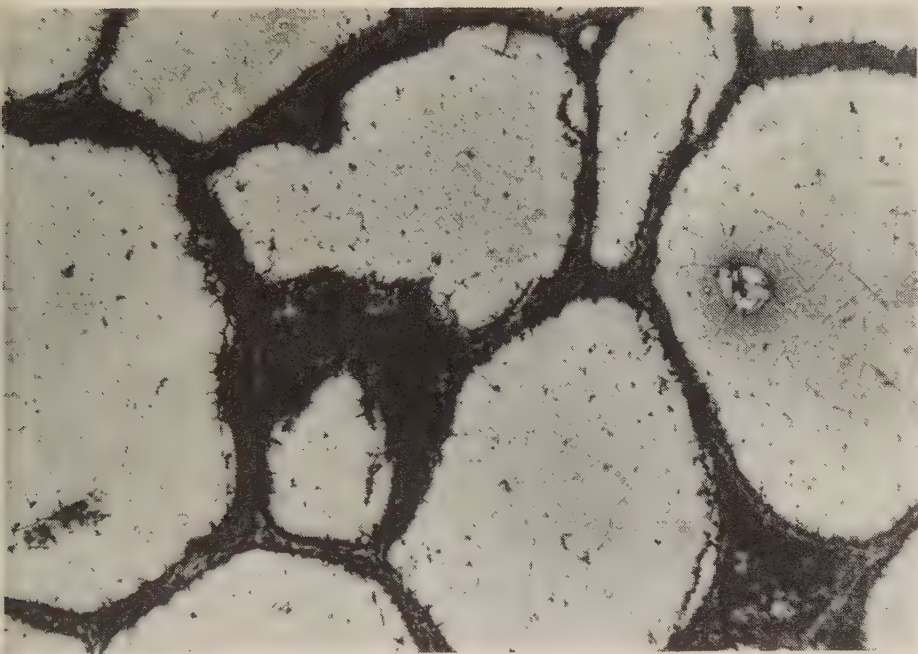


Abbildung 2

Schweineschilddrüse. Nach Alkohol- und H_2O -Behandlung von je 30 Minuten. Reaktion nach MÜLLER: Silbernitrat-Aceton(2,0/100,0)-Bariumhydroxid-Methanol(5,0/100,0) 30 Minuten, Zimmertemperatur. Vergrößerung: 32 x

Hier wurde vor der eigentlichen Reaktion zuerst mit Alkohol und H_2O behandelt. Die Follikelzellen sind dunkelgrau bis schwarz gefärbt. Die Granula sind in ihrer ursprünglichen Lage. Insofern unterscheidet sich dieses Bild nicht von denjenigen, die nur mit der $AgNO_3$ -Aceton- $Ba(OH)_2$ -Methanol-Reaktion behandelt wurden.

Die C-Zellen sind allerdings nicht mehr so deutlich erkennbar.

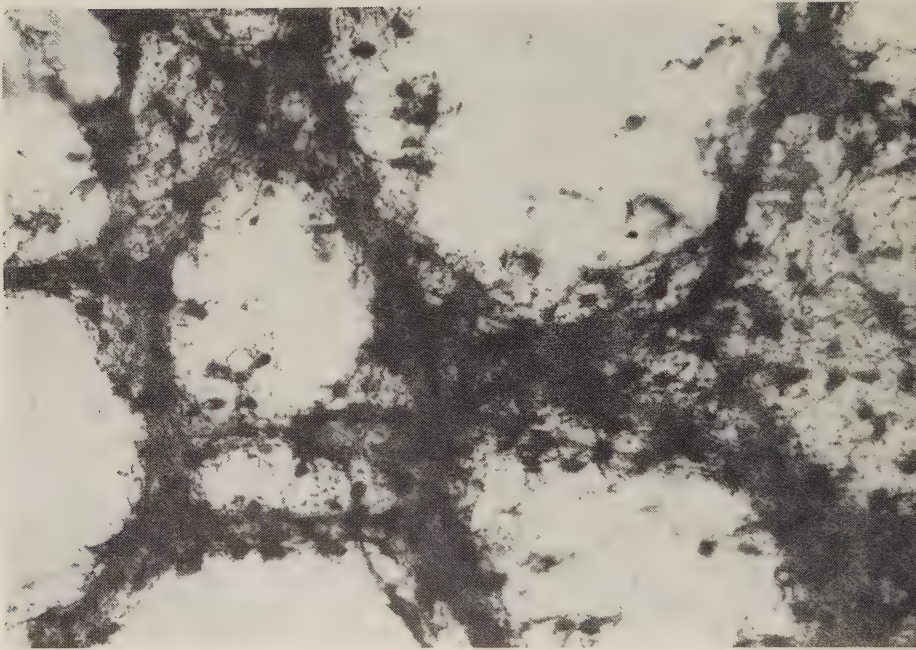


Abbildung 3

Schweineschilddrüse. 30 Minuten mit destilliertem Wasser behandelt, anschließend Reaktion nach MÜLLER: Silbernitrat-Aceton(2,0/100,0)-Bariumhydroxid-Methanol(5,0/100,0), 30 Minuten, Zimmertemperatur. Vergrößerung: 120 x

Durch das Wässern ist es zu Dislokationen der Granula gekommen. Sie verklumpen oder bilden Netze, die über dem Präparat zu liegen scheinen.

Die diffuse Braunfärbung ist völlig herausgelöst.



Abbildung 4

Rinderschilddrüse. Reaktion nach MÜLLER:
Silbernitrat-Aceton(2,0/100,0)-Bariumhydroxid-
Methanol(5,0/100,0)
60 Minuten, Zimmertemperatur. Vergrößerung: 32 x

Die Rinderschilddrüsen verhalten sich völlig anders gegenüber der AgNO_3 -Aceton- Ba(OH)_2 -Methanol-Reaktion als die Schweine- und Menschenschilddrüsen. Es ist hier nicht möglich zwei verschiedene Zelltypen zu unterscheiden. Auch wird das gesamte Kolloid von der Reaktion erfaßt und zeigt im Präparat einen rötlich-braunen Farbton.

Übersicht über den Reaktionsausfall bei Schilddrüsenschnitten
von einem etwa eineinhalb Jahre alten Eber

Bariumhydroxid- Methanol	Silbernitrat- Aceton	Silbernitrat- Aceton + HE	Kontrolle	Alkohol+H ₂ O + Silbernitrat- Aceton
10 min.	(+)	(+)	+	+
20 min.	+	+	+	+
30 min.	++	++	-	+
60 min.	++	++	-	+

- + = ganz schwache Reaktion; (+) = schwache Reaktion;
 + = mittlere Reaktion; ++ = starke Reaktion;
 - = Präparat nicht auszuwerten;

Übersicht über den Reaktionsausfall bei Schilddrüsen Schnitten
von einem 61-jährigen Mann

Ba (GH)2 Methanol	AgNO ₃ - Aceton	AgNO ₃ -Aceton + HE	Kontrolle	Alkohol+H ₂ O+AgNO ₃ - Aceton + HE
10 min.	++	++	-	auf diese Reaktion wurde bei diesem Objekt verzichtet
20 min.	(+)	+	-	
30 min.	(+)	+	+	
60 min.	+	+	+	

- 33 -

++ = kaum feststellbare Reaktion; (+) = schwache Reaktion;
+ = mittlere Reaktion; - = Präparat nicht aus-
zuwerten;

V. Diskussion

A) Ist eine spezifische Darstellung der parafollikulären Zellen mit der AgNO_3 -Aceton- Ba(OH)_2 -Methanol-Reaktion möglich?

Bei den untersuchten Präparaten können nur bei den Schnitten der Schweine- und Menschenschilddrüsen zwei verschiedene Zelltypen unterschieden werden. Außer den Follikelzellen kommen bei diesen noch über das ganze Präparat verstreut-
liegende polygonale Zellen vor. Das Cytoplasma dieser Zellen wird von der Reaktion kaum erfaßt, so daß sie deutlich als helle Aussparungen zu erkennen sind. Sie haben einen runden bis ovalen Kern in Zellmitte, liegen fast ausschließlich einzeln und berühren das Follikellumen nie. Da diese Charakterisierung mit dem unter II. Vorbemerkungen über Lage, Verteilung, Häufigkeit und Aussehen der C-Zellen besagtem übereinstimmt, ziehe ich den Schluß, daß es sich hierbei um parafollikuläre Zellen handelt.

Anders sind dagegen die Beobachtungen in den Schnitten der Rinderschilddrüsen zu deuten. Hier wird die Mehrzahl der Follikelzellen graubraun gefärbt. Das nur sehr selten auftretende helle Braun hält sich nicht an Zellgrenzen. Diese helleren Stellen enthalten meist keinen Zellkern, sind verschieden groß und berühren auch häufig das Follikellumen. Es gelingt bei dieser Spezies nicht zwei verschiedene Zelltypen zu identifizieren. Eine Darstellung der para-

follikulären Zellen ist also hier nicht möglich.

B) Kann mit der von MÜLLER (1964) angegebenen Reaktion ein spezifischer Calcitoninnachweis geführt werden?

Thyreocalcitonin wird in den hellen Bläschen der para-follikulären Zellen gespeichert (MATSUZAWA et al., lit.c.). Da in einem Molekül Calcitonin zwei Moleküle Cystein enthalten sind, müßte in diesen Bläschen auch eine Anreicherung dieser Aminosäure vorliegen, die man vielleicht mit der AgNO_3 -Aceton- Ba(OH)_2 -Methanol-Reaktion durch eine Schwärzung erfassen könnte.

Da bei den Rinderschilddrüsen keine Darstellung der parafollikulären Zellen möglich war, kann ich folgende Besprechung auf die Schweine- und Menschenschilddrüsen beschränken.

In den C-Zellen von Mensch und Schwein sind deutliche Reaktionseinwirkungen in Form schwarzer Granula zu sehen. Ihrer Größe und Verteilung entsprechend könnte man sie gut mit den Calcitonin enthaltenen hellen Bläschen in Einklang bringen.

Doch sind in den parafollikulären Zellen noch zwei weitere Bläschenformen beschrieben, über deren Funktionen und Inhalt man noch recht wenig weiß. Vor allem ist es nicht sicher, ob sie nicht reduzierende Fermente enthalten, wie z.B. die λ -GPD (λ -Glycerophosphat Menadion Reductase),

die, nach PEARSE (1969), in den parafollikulären Zellen konzentriert vorhanden sein soll. Es liegt dennoch die Vermutung sehr nahe, daß das Calcitonin der hellen Bläschen für die schwarzen Granula verantwortlich zu machen ist. Doch kann man dies mit Sicherheit nur radiologisch oder fluoreszenzimmunologisch beweisen. Das bedeutet, daß ein spezifischer Calcitoninnachweis mit dieser Reaktion weder beim Schwein noch beim Menschen oder Rind möglich ist.

C) Versuch, den Reaktionsausfall in den Follikelzellen zu deuten

Die Follikelzellen zeigen bei den untersuchten Spezies überall zwei gut voneinander zu trennende Reaktionseinkwirkungen, nämlich eine gleichmäßige Braunfärbung des Cytoplasmas und schwarze Granula. Es ist vorstellbar, daß freie Galaktose-, Mannose- und Fruktosemoleküle, die in den unter II. beschriebenen Zellorganellen in die Thyreoglobulinbruchstücke eingebaut werden, die diffuse Färbung verursachen.

Die schwarze Granulierung wird sicherlich von den eingangs beschriebenen $0,15 \mu$ großen kugeligen Bläschen verursacht. Diese kommen in der Zellspitze als sogenannte Spitzenbläschen gehäuft vor und sind auch anschließend im Kolloid zu sehen. Ob in ihnen der Cystein- oder der Hexoseanteil des S 12 Thyreoglobulinbruchstückes die Reaktion verur-

sacht ist nicht zu entscheiden. Sicher ist aber, daß beim Menschen und beim Schwein die Granula der Follikelzellen überall gleiche Größe und gleiche Farbe haben. Das bedeutet, daß die ebenfalls von LEPLOND (1963) beschriebenen $1,5 \mu$ großen glatt begrenzten Kugeln, die er als Kolloidtröpfchen bezeichnet, nicht reagieren. Und dies wäre ein Beweis dafür, daß diese Kugeln tatsächlich Kolloid enthalten und das in ihm enthaltene, vollständige S 19 Thyreoglobulinmolekül nicht mehr durch die AgNO_3 -Aceton- Ba(OH)_2 -Methanol-Reaktion zu erfassen ist.

Diese Hypothese würde auch die Beobachtungen im Follikellumen erklären. Ein sicherer Beweis ist aber auch hier nur auf radiologischem oder immunologischem Wege möglich.

VI. Zusammenfassung

Histologische Schnitte von Schweine-, Rinder- und Menschenschildrüsen wurden in verschiedenen Versuchsreihen mit der AgNO_3 -Aceton- Ba(OH)_2 -Methanol-Reaktion auf reduzierende Substanzen untersucht. Es wurde dabei festgestellt, daß

1. Die Follikelzellen bei allen Spezies deutlich reagieren.
2. Im Follikellumen der Menschen- und Schweineschildrüsen lediglich eine schmale Randzone, beim Rind auch das gesamte Kolloid von der Reaktion erfaßt wird.
3. Die parafollikulären Zellen mit der AgNO_3 -Aceton- Ba(OH)_2 -Methanol-Reaktion nur beim Menschen und beim Schwein darzustellen sind; bei Rinderschildrüsen diese Methode versagt.
4. Ein spezifischer TCT Nachweis mit der Reaktion nach MÜLLER (1964) nicht möglich ist.

VII. Literaturverzeichnis

1. BREWER, H.B., KENTMANN, H.T.,
POTTS, J.T.: Isolation and chemical
properties of porcine
thyrocalcitonin.
J.Biol.Chem. 243,
739-747 (1968)
2. BREWER, H.B., Jr., et al.: The amino acid sequence
of bovine thyrocal-
citonin.
Proc.Nat.Acad. Sci.,
63, 862 (1969)
3. CARVALHEIRA, A.F. and
PEARSE, A.G.E.: Cytochemical evidence
for the ultimobranchial
origin of the C cells
in rodent thyroid.
Proceedings of the Sym-
posium on Thyrocalci-
tonin and the C cells
1967, edited S.Taylor,
Heinemann, London,
p. 122 (1968)
4. COPP, D.H. et al.: Evidence for calcitonin
- a new hormone from the
parathyroid that lowers
blood calcium.
Endocrinology, 70,
638-649 (1962)
5. EHRENBRAND, F.: Untersuchungen über Ge-
nese und Funktion der
parafollikulären Zellen
der Schilddrüse.
Zschr.mikr.anat. For-
schung 60, 337-354 (1954)
6. EHRENBRAND, F.: Über den Ausfall der
Reaktion nach OKAMOTO,
KADOTA und AOYAMA in
der laktierenden Milch-
drüse des Goldhamsters.
Acta histochem. 12,
337-339 (1961)

7. ERICSON, L.E.: Subcellular Localization of 5-Hydroxytryptamine in the parafollicular cells of the mouse thyroid gland. An autoradiographic study. J. Ultrastructure Research 31, 162-177 (1970)
8. ERICSON, L.E.: Degranulation of the parafollicular cells of the rat thyroid by Vitamin-D₂-induced hypercalcemia, J. Ultrastruc. Res. 24, 145 (1968)
9. GABE, M.: Données histochimiques sur les cellules para-folliculaires de la glande thyroïde du chien. Acta anat. 35, 332-344 (1959)
10. GERBER, H.G.: Topochemische und histochemische Untersuchungen zum Nachweis von Aminosäuren in Filterpapierversuchen und in Gewebsschnitten mit der AgNO₃-Aceton-Ba(OH)₂-Methanol-Reaktion. Acta histochem. 30, 364-379 (1968)
11. GEYER, G.: Untersuchungen zum histochemischen Glukosenachweis in der Niere. Acta histochem. 9, 329-338 (1960)
12. GEYER, G.: Histochemischer Nachweis von Carboxylgruppen mit der Carbodiimidreaktion. Acta histochem. 19, 73 (1964)
13. GUDMUNDSON, T.V.,
Mac INTYRE, J.,
SOLIMAN, H.A.: The Isolation of Thyrocalcitonin and a Study of its Effects in the Rat. Biological Sciences, 164, 460-471 (1966)

14. ITO, R.: Ultrastructure of Para-follicular Cells in Mammals. Acta anat. nipponica 40, 48 (1965)
15. LANGE, W.: Zur Topochemie der reduzierbaren Substanzen im ZNS der weißen Ratte nach Glukoseinjektionen. Verh.anat.Ges. 61, 375-381 (1967)
16. LEPLOND, C.P., YOUNG, B.A.: The Light Cell as compared to the Follicular Cells in the Thyroid Gland of the Rat. Endocrinology, 73, 669-686 (1963)
17. LEPLOND, C.P., GONCALVES, R., BENEFF, G.C.: Fate of ^3H Ribose in the Rat as detected by Radioautography. Anat.Record 165, 85-96 (1965)
18. LEPLOND, C.P., WHUR, P., HERSCOVICS, A.: Radioautographic Visualization of the Incorporation of Galactose- ^3H and Mannose- ^3H by Rat Thyroglobulin synthesis. J. of Cell Biology 43, 126-132 (1969)
19. LIETZ, H., SCHMÄHLING, U., ZIPPEL, H.: Veränderungen an den C-Zellen der Rattenschilddrüse bei Hyper- und Hypocalciämie. Virchows Arch.Abt. A Path. Anat. 348, 290-305 (1969)
20. LUCIANO, L.u.REALE,E.: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an para-follikulären Zellen der Rattenschilddrüse. Zschr. Zellforschg. 64, 751-766 (1964)
21. Mac INTYRE, J.: Calcitonin: a general review. Calc. tiss. Res. 1, 173-182 (1967)

22. MATSUZAWA, T. and KUROSUMI, K.: Morphological changes in the parafollicular cells of the rat thyroid glands after administration of calcium shown by electron microscopy, *Nature (London)* 213, 927 (1967)
23. MEANS, B.A., WOLLMANN, A.D., NADLER, T. and GROSS, R.P.: Symposium on the Thyroid Gland organized by the Chemical Pathology Subcommittee of the Association of clinical Pathology Edited by G.K. Mc Gowan and M. Sandler (1967)
24. MILHAUD, G. et al.: Epithélioma de la thyroïde sécrétant de la thyrocalcitonine. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris* 266, 608 (1968)
25. MÜLLER, G.: Über den histotopochemischen Nachweis von Glukose in der Leber und Niere der weißen Maus. *Acta histochem.* 2, 73-80 (1965)
26. MÜLLER, G.: Histotopochemische Untersuchungen über die Glukoseresorption im Darm der weißen Maus. *Acta histochem.* 3, 165-220 (1957)
27. MÜLLER, G.: Die Fixierung von Glukose und 3-O-Methylglukose an Filterpapier und ihr Nachweis durch die Reaktion nach OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA. *Acta histochem.* 14, 270-275 (1962)
28. MÜLLER, G.: Über den autoradiographischen Nachweis von C^{14} -Galaktose und H^3 -O-Methylglukose im Rattendarm. *Acta histochem.* 19, 97-103 (1964)

29. MÜLLER, G.: Histotopochemische Untersuchung der Xylitresorption im Rattendarm. Klin. Wschr. 42, 454-456 (1964)
30. MÜLLER, G.: Der histotopochemische Nachweis wasserlöslicher Kohlenhydrate. Verh.anat.Ges. 60, 165-173 (1965)
31. NANBA, H., FUJIA, H.: Fine structure of the thyroid parafollicular cells in normal, Vitamin D and CaCl_2 -Treated and CaCl_2 -Treated Mice. Arch.hist.japonicum 30, 283-293 (1969)
32. NEHER, R. et al.: Menschliches Calcitonin.III. Struktur von Calcitonin M und D. Helvet. Chim. Acta 51, 1900 (1968)
33. NUNEZ, E.A. et al.: Seasonal changes in secretory granules and crystalloid inclusions of bat thyroid parafollicular cells. J. Cell Sci. 6, 821-841 (1970)
34. OLIVEREAU, M.: Données cytologiques et autoradiographiques sur la glande thyroïde de quelques mammifères hibernants. Activité thyroïdienne et présence de cellules C à calcitonine. Z. Zellforsch. 107, 374-402 (1970)
35. PAK, C.Y.C., RUSKIN, B. and CASPER, A.: Renal effects of Thyrocalcitonin Proceedings of the Second International Symposium on Calcitonin (1969), edited S. Taylor, Heinemann Medical Book, London, p.154 (1969)
36. PEARSE, A.G.E.: The cytochemistry of the thyroid C-cells and their relationship to calcitonin, Proc.Roy.Soc.B., 164, 478 (1966)

37. POTTS, J.T., Jr. et al.: The amino acid sequence of porcine thyrocalcitonin. Proc.Nat.Acad.Sci., 59, 1321 (1968)
38. PUSCH, I.: Der topochemische Nachweis wasserlöslicher Kohlenhydrate im Filterpapierversuch durch die AgNO_3 -Aceton- Ba(OH)_2 -Methanol-Reaktion. Med.Diss., Mainz (1965)
39. ROBBINS, I. and RALL, I.E.: Proteins Associated with the Thyroid Hormones. Physiological Reviews, Vol. 40, 415-489 (1960)
40. SAMPIETRO, R. and SOLCIA, E.: Calcitonin. Proceedings of the Symposium on Thyrocalcitonin and C cells. P.127 (1968), Wm. Heinemann Medical Books, London
41. SANRITTER, W. and KLEIN, K.H.: Über Argyrophile Zellen in der Schilddrüse, Frankfurt. Z.Path., 65, 204 (1954)
42. SEARLE, G.L. and CAVALIERI, R.R.: Biosynthesis of thyroglobulin and subunits in the rat thyroid gland. Biochem. J. 102, 25 c (1967)
43. SEED, R.W. and GOLDBERG, J.H.: Biosynthesis of thyroglobulin. II Role of subunits, iodination and ribonucleic acid synthesis. J.Biol.Chem. 240, 764 (1965)
44. SOLCIA, E. et al.: Selective staining of endocrine cells by basic dyes after acid hydrolysis, Stain Technol. 43, 257 (1968)
45. STILLER, D.: Histotopochemische Untersuchungen zum Nachweis von Monosacchariden. 1. Untersuchungen zur Fixierung und zum Nachweis verschiedener Zucker mittels Papierstreifen durch die Reaktion von OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA. Acta histochem. 21, 299-312 (1965)

46. STILLER, D.: Histotopochemische Untersuchungen zum Nachweis von Monosacchariden. 2. Untersuchungen zur Fixierung und zum Nachweis verschiedener Zuckerphosphate mittels Filterpapierstreifen durch die Reaktion von OKAMOTA, KADOTA und AOYAMA. Acta histochem. 22, 46-52 (1965)
47. STUX, M.B., THOMPSON, H. and LEPLOND, C.P.: The "Light Cells" of the thyroid gland in the rat. Endocrinology 68, 292-308 (1961)
48. TASHIRO, M.: Electron microscopic studies of the parafollicular cells in the thyroid gland of the dog. Okajimas Fol.jap.anat. 39, 191-211 (1964)
49. WELLS, H. and LLOYD, W.: Hypercalcaemic and hypophosphataemic effects of dibutyryl cyclic AMP in rats after parathyroidectomy, Endocrinology, 84, 861-867 (1969)
50. YOSHIMURA, F., YONETSU, T., NAKAMURA, M.: Hormonal regulation of para-follicular cells in thyroid gland. Endocrin. Jap. 9, 284-301 (1962)
51. YOUNG, B.A., CARE, A.D. and DUNCAN, T.: Some observations on the light cells of the thyroid gland of the pig in relation to thyrocalcitonin production, J.Anat. (London), 102, 275 (1968)
52. ZIEGLER, R., LEMMER, B., PFEIFFER, E.F.: Über die Einwirkung von Thyrocalcitonin auf die Phosphaturie. Klin.Wschr. 45, 34 (1967)

Herrn Prof. Dr. G. MÜLLER möchte ich dafür danken,
daß er mir dieses Thema überlassen hat, jederzeit
für meine Probleme Verständnis zeigte und mir mit
wertvollen Ratschlägen und Hinweisen die Durchführung
der Arbeit sehr erleichterte.

Lebenslauf

Am 31. Dezember 1944 wurde ich, Roland Ernst Mayer, als Sohn des Elektromechanikers Franz Mayer und seiner Ehefrau Emilie geb. Stoll in Heidelberg geboren. Von 1952 bis 1958 besuchte ich die Volksschule in Rheinzabern/Pfalz und von 1958 bis 1966 das Goethe-Gymnasium in Karlsruhe. Nach erlangter Hochschulreife am 4. 3. 1966 begann ich 1967 mein Medizinstudium in Mainz. Dort legte ich auch am 21. 3. 1968 die Naturwissenschaftliche und am 9. 10. 1969 die Ärztliche Vorprüfung ab. Mein klinisches Studium absolvierte ich in Mainz, am St. Mary's Hospital in London, am Queen Mary's Hospital in Hong Kong und am Klinikum rechts der Isar in München, wo ich am 20. 12. 1972 die Ärztliche Prüfung ablegte. Am 1. Februar 1973 werde ich meine Medizinalassistentenzeit beginnen.

Handwritten text at the top right of the page, possibly a date or reference number.

Main body of the document containing several paragraphs of handwritten text, which is mostly illegible due to fading and bleed-through from the reverse side.

